

# 广西红菇子实体及分离株的 rDNA ITS序列分析

## Nucleotide Sequence Analysis on ITS rDNA of Fruitbodies and Isolates of *Russula* in Guangxi

王桂文 孙文波

Wang Guiwen Sun Wenbo

(广西科学院生物研究所 南宁市大岭路 98号 530003)

(Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, 98 Dalinglu, Nanning, Guangxi, 530003, China)

**摘要** 为了研究广西食用红菇 rDNA ITS片段遗传多样性,鉴别红菇组织分离株的真伪,用一对通用引物对采自广西浦北县、容县和上思县的 18个红菇子实体样本及 3个组织分离株的 rDNA ITS片段进行 PCR扩增,扩增产物纯化后测序,运用相关序列分析软件对 ITS区全序列进行分析,并和 GenBank/EMBL/DDBJ三大核酸序列数据库进行同源性检索。结果获得 12个红菇子实体和 3个分离株的 ITS和 5.8S rDNA区段的完整序列,3个分离株的 ITS序列全长明显小于子实体样本的 ITS序列全长;3个组织分离株与红菇属真菌的遗传距离大;除 2个采自浦北龙门的子实体与其它子实体的同源性小于 0.95外,来自不同区域的其余子实体样本间 rDNA ITS序列同源性都达到 0.98以上;12个子实体的 ITS区段与 GenBank中已知的红菇属真菌的相似率都不大于 0.90。由此推断 3个组织分离株均不是红菇的分离株而可能是子实体的寄生菌或污染菌;广西浦北县、容县和上思的食用红菇样本没有地理类群差异,但在浦北产区可能存在多种食用红菇共生。

**关键词** 红菇 子实体 组织分离株 rDNA ITS序列

中图分类号 Q949.32

**Abstract** To analyze the genetic diversity on ITS rDNA of edible *Russula* fungi in Guangxi, China and to authenticate isolates by means of sequence analysis, the rDNA ITS regions of fruitbodies and isolates were amplified using primer pair ITS-P1, ITS-P4, and then purified and sequenced. Total ITS sequence analysis were performed using software BioEdit v5.06 and Clustal X1.8, and BLAST matched with GenBank database on homology. The total ITS rDNA sequences of twelve fruitbodies and three isolates were obtained, and the sequence length of three isolates were less than fruitbodies. The difference in sequence alignment, homogenous analysis and BLAST match demonstrated that the genetic distance of isolates were far from *Russula* fungi evidently. The sequence similarities of all fruitbodies from three geographical situs were up to 0.98 except for two from Pubei county, and the sequence similarities between either bodies and species of *Russula* from GenBank database couldn't identify to species level. The result demonstrated that three isolates used in our study were not the right strains of *Russula* fungi but potential parasites of fruitbody or contamination, and there was n't geobiological difference between edible *Russula specimens* obtained from Pubei county, Rongxian county and Shangsi county in Guangxi, but up to two species of edible *Russula* occurred potentially in Pubei county.

**Key words** *Russula*, fruitbodies, isolates, rDNA, ITS sequence

红菇属 (*Russula*) 是担子真菌中的一个属。红菇真菌既是对林木生长有重要意义的外生菌根真菌, 又是有重要经济价值的食用真菌, 在世界各地都有广泛分布<sup>[1]</sup>。红菇在广西主要分布在浦北的六万大山, 容县、藤县的大容山和上思的十万大山。由于红菇的

经济价值较高, 干菇收购价格不断上升, 导致野生资源日渐贫乏, 对其进行合理的保护利用和野生驯化栽培刻不容缓。不少学者对红菇的生态环境、分类地位、组织分离及菌丝营养等都进行了相应的研究<sup>[2-4]</sup>, 但是红菇属真菌种类很多, 很难分类<sup>[1,5]</sup>, 依据传统的形态特征进行分类鉴定带有一定的局限性和主观性, 例如, 对广西浦北食用红菇的分类地位就有多种不同的

鉴定结果<sup>[2,4,6]</sup>。此外,红菇是外生菌根真菌,文献[3]对其进行了组织分离,并进行了相应的菌丝营养研究,但目前尚不能人工栽培出红菇子实体,无法令人信服地证明所分离到的菌株就是目标菌株

快速发展的分子生物学技术正成为窥视外生菌根真菌生态学未知世界的有力工具<sup>[7]</sup>,在外生菌根群体生态、真菌与宿主植物的关系等研究中,有越来越多的研究者通过提取外生菌根根尖的DNA或土壤中的总DNA,用特异引物扩增rDNA ITS区段并测序来获取相关信息<sup>[8-10]</sup>。有学者尝试通过建立rDNA ITS区全序列数据库对待检物种进行鉴别<sup>[11]</sup>。而越来越多的基于ITS区段的序列测定结果向GenBank/EMBL/DBJ三大数据库提交,有可能通过rDNA ITS序列检索鉴定相关的种,同时又能进行相应的系统进化分析。本文对采自广西浦北县、上思县、容县的子实体样品,和3个可能是红菇的组织分离株的rDNA ITS区序列进行扩增、测序及分析,以期了解该区域食用红菇rDNA ITS片段的遗传多样性,并鉴别3个组织分离株的真伪

## 1 材料与方法

### 1.1 菇体标本及菌株

在红菇发生季节到浦北县、上思县、容县等产区采集鲜菇子实体,编号后,低温带回实验室,置-20℃冰箱保存。Ru01, Ru02, Ru03, Ru06, Ru07采自容县浪水乡大容山区, Ru08, Ru10, Ru11, Ru13, Ru14, Ru42采自上思县十万大山林场, Ru16, Ru19, Ru21, Ru22, Ru46, Ru47, Ru48采自浦北县龙门镇六万大山山区。共18个子实体,其中Ru47为干菇样品, Ru48号子实体形态特征明显不同于其他子实体,当地农民称为“假红菇”。除Ru48外,所有子实体均为形态特征基本相同、当地大量生长的食用红菇。

正红菇(*R. vinosa*)组织分离菌株Ru201分离自容县,由广西大学农学院莫天视教授惠赠; Ru-y<sub>n</sub>购自中国科学院昆明植物研究所; R3由本实验室分离自浦北县

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菇体及菌丝总DNA提取

取0.2g子实体组织或刮取组织分离菌株的一个PDA斜面,加液氮研磨成粉末状,加入1000μl裂解缓冲液(Tris-HCl 50 mmol/L, pH值8.0; EDTA 50 mmol/L, pH值8.0; NaCl 1.4 mol/L; CTAB 3%)充分混匀,65℃水浴1h,12000 r/min离心5 min,取上清液加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(24:24:1),轻摇30 s,12000 r/min离心10 min,收集上清

液,以2倍以上无水乙醇沉淀DNA,挑出絮状沉淀,在70%乙醇中洗涤后沥干。50μl TE (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH值8.0)溶解,分光光度计测定浓度,-20℃保存备用

#### 1.2.2 ITS区段的PCR扩增、产物纯化及测序

红菇rDNA ITS区段的扩增和测序引物为ITS-P1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS-P4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')<sup>[12]</sup>。PCR反应体系的组成为10× Buff 5μl, 25μmol/L Mg<sup>2+</sup> 3μl, 10 mmol/L dNTP 1μl, 10μmol/L引物各1μl, 模板DNA 1μl(终浓度在50 ng μl左右), Taq酶1U(0.2μl),用无菌纯水定容至50μl。PCR反应采用德国产Biometra UNOII型PCR仪,循环参数为:预变性95℃,2 min,变性94℃,40 s,退火60℃,40 s,延伸72℃,45 s;补平72℃,5 min,共进行35个循环。PCR产物经试剂盒纯化后由上海中科开瑞公司测序。

#### 1.2.3 ITS序列排序及系统分析

所得序列经Clustal X 1.8软件对位排列,并辅以人工校对。ITS1和ITS2的起止范围参照GenBank中红菇属真菌的ITS范围确定。用BioEdit v5.06软件对各序列的ITS区(ITS+ ITS- 5.8S)进行系统分析,用最适全局排序选项进行成对同源性对比;neighbor-joining法构建NJ系统树,各分支的置信度经bootstrap法1000次循环检验各分支的系统学意义与可靠性

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA的提取及PCR

包括干菇样品Ru47在内,每个样品均能提取适合PCR的总DNA,用引物ITS-P1和ITS-P2很容易就能扩增到rDNA ITS区段。图1为部分子实体和分离株的PCR产物电泳结果。由图1可见组织分离株的PCR产物分子量均比子实体的小。

### 2.2 rDNA ITS区段测序结果

18个红菇子实体和3个组织分离株的rDNA ITS区段的PCR产物测序结果是,12个子实体和3个分离株能测通,获得ITS区段的全序列,其ITS1和ITS2长度和GC含量见表1。序列排序后,子实体的ITS1长度为189bp~191bp,变异位点33个,ITS2长度259bp~279bp,变异位点78个。ITS1长度较短,所包含的变异位点和信息位点明显比ITS2少,GC含量比ITS2高。子实体样品的ITS区域长度为607~630bp,而组织分离株的仅为563~589bp。由于子实体样品的ITS序列GC含量较高,在ITS2中出

现两处由 5~ 10个 A碱基及 T碱基联排的序列片段, 测序难度大, 部分样品无法测通。

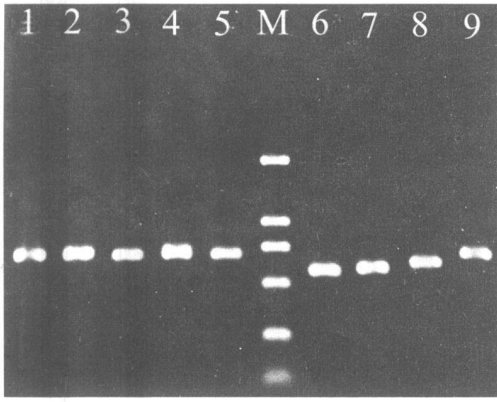


图 1 红菇样品 rDNA ITS区段的 PCR产物

Fig. 1 PCR products of rDNA ITS of *Russula* fruitbodies and isolates

泳道 1~ 5, 9为子实体, 依次为 Ru07, Ru08, Ru14, Ru16, Ru22, Ru47; 泳道 6~ 8为组织分离株, 依次为 R3, Ru201, Ru-yn; M为 DNA分子量标记 (DL2000, bp): MW 2000, 1000, 750, 500, 200, 100

Lane 1~ 5 and 9 were fruitbodies Ru07, Ru08, Ru14, Ru16, Ru22 and Ru47, respectively. lane 6~ 8 are isolates R3, Ru201, Ru-yn. M was DNA marker (DL2000, bp): MW 2000, 1000, 750, 500, 200, 100.

序列排序后, 分离株的 5. 8S rDNA序列有 4个位点的碱基与子实体的不同。表明这 3个组织分离株的 rDNA ITS序列与子实体样品的差别较大。子实体样品中, 采自浦北的 Ru16 Ru46在 ITS2区段插入了一段 13bp的碱基序列 CAGGGAAAAGGAT, 而在其他样品中是没有的。

### 2. 3 rDNA ITS区段的遗传多样性分析

BioEdit v5. 06软件对各样品序列的 ITS区全序

表 2 各红菇子实体、分离株之间 rDNA ITS序列的同源性 (左下) 及排序分值 (右上)

Table 2 Identities (lower left) and alignment scores (upper right) of fruitbodies and isolates in ITS rDNA sequences

样品 编号 Code	Ru02	Ru03	Ru06	Ru07	Ru08	Ru14	Ru16	Ru22	Ru42	Ru46	Ru47	Ru48	Ru201	R3	Ru-yn
Ru02		594	594	594	573	587	491	594	586	521	597	384	- 11	8	88
Ru03	0. 99		609	605	583	598	500	593	597	523	607	391	- 6	9	81
Ru06	0. 99	1. 00		605	585	598	500	593	597	523	607	391	- 6	10	81
Ru07	0. 99	1. 00	1. 00		583	598	498	593	597	523	607	391	- 10	9	81
Ru08	0. 98	0. 98	0. 98	0. 98		589	488	584	586	516	585	387	- 12	7	80
Ru14	0. 98	0. 99	0. 99	0. 99	0. 99		496	599	593	521	602	390	- 8	10	82
Ru16	0. 91	0. 91	0. 91	0. 91	0. 90	0. 91		496	499	540	500	390	- 7	3	80
Ru22	0. 99	0. 99	0. 99	0. 99	0. 98	0. 99	0. 91		588	524	597	390	- 7	4	82
Ru42	0. 99	0. 99	0. 99	0. 99	0. 99	0. 99	0. 91	0. 98		525	599	392	- 7	9	78
Ru46	0. 93	0. 93	0. 93	0. 93	0. 93	0. 93	0. 95	0. 93	0. 93		525	390	- 16	- 5	81
Ru47	0. 99	1. 00	1. 00	1. 00	0. 98	1. 00	0. 91	0. 99	0. 99	0. 93		393	- 6	9	83
Ru48	0. 83	0. 84	0. 84	0. 84	0. 84	0. 84	0. 83	0. 84	0. 84	0. 83	0. 84		9	7	104
Ru201	0. 53	0. 53	0. 53	0. 53	0. 53	0. 53	0. 55	0. 53	0. 53	0. 53	0. 53	0. 55		265	11
R3	0. 57	0. 57	0. 57	0. 57	0. 56	0. 57	0. 57	0. 57	0. 57	0. 56	0. 57	0. 55	0. 76		4
Ru-yn	0. 62	0. 62	0. 62	0. 62	0. 61	0. 62	0. 61	0. 62	0. 61	0. 61	0. 62	0. 65	0. 56	0. 55	

表 1 ITS1 ITS2的序列长度及 GC含量

Table 1 Length and GC content of ITS1 and ITS2 sequences

样品 Samples	编号 Code	长度 Length (bp)				GC含量 GC Content (%)	
		ITS1	ITS2	ITS1+ + 5. 8S	ITS2	ITS1	ITS2
子实体 Fruitbody	Ru02	193	265	618	52. 33	44. 91	
	Ru03	191	263	614	52. 88	44. 87	
	Ru06	191	263	614	52. 88	44. 87	
	Ru07	191	263	614	52. 88	45. 25	
	Ru08	190	262	612	52. 11	44. 27	
	Ru14	191	262	613	52. 36	45. 80	
	Ru16	191	279	630	52. 88	48. 03	
	Ru22	191	264	615	52. 88	45. 08	
	Ru42	191	264	615	52. 88	44. 70	
	Ru46	191	278	629	50. 79	46. 76	
分离株 Isolate of Fruitbody	Ru47	191	263	614	52. 88	45. 25	
	Ru48	189	259	607	53. 44	49. 42	
	Ru201	194	235	589	/	/	
	R3	170	244	574	/	/	
	Ru-yn	193	210	563	/	/	

列进行系统分析, 最适全局排序选项进行同源性成对对比的结果见表 2 表 2显示, “假红菇” Ru48与其它子实体的同源性较低, 为 0. 83~ 0. 84, 其余的子实体分为两群: 采自浦北龙门的 Ru16 Ru46与其它子实体的同源性相对较低, 分别为 0. 91, 0. 93, 但二者之间的同源性为 0. 95 3个分离株与各子实体的同源性很低, Ru-yn稍高, 也仅为 0. 61~ 0. 65

## 2.4 rDNA ITS区段同源性检索

与 GenBank 核酸序列数据库进行序列相似性检索得到各样品的最相似的物种名称、登录号及其相似值见表 3。表 3 显示, 各子实体样品的 ITS 区段与 GenBank 中已知的红菇属真菌的相似率均不大于 0.90。与各子实体样品最相似的前 3 种真菌均为红菇属真菌, 分别是: *R. vinosa* (AF418638), *R. vinosa* (AY061724), *R. vinosa* (RV1534938), *R. claroflava* (AY061665), *R. curtipes* (AY061668), *R. cuprea* (AY061667), *R. rosea* (AY061715); 下载上述菌株的 rDNA ITS 区段序列, 与子实体、分离株样品一起, 用 neighbor-joining 法构建 NJ 系统发育树 (图 2)。由图 2 可见, 3 个组织分离株 Ru-yn, Ru201, R3 与红菇属真菌的遗传距离很大, 明显不属于红菇属真菌。子实体样品中, 来源于不同产地的食用红菇 Ru47, Ru02, Ru14, Ru22, Ru07, Ru03, Ru06, Ru42 和 Ru08 关系密切, 可以认为是一个种, 而采自浦北的 Ru16, Ru46 遗传距离很接近, 与其它子实体样品的关系较远, 为另一个种。“假红菇” Ru48 与其它子实体样品的关系更远。不管是分离株或子实体样品, 与 GenBank 中已测定的红菇属真菌的亲缘关系均较远。因此, 类群 (种) I 是广西广泛分布的食用红菇, 没有地理类群差异, 而类群 (种) II 仅在浦北出现, 但所有的子实体样品与 GenBank 中已知的红菇属真菌表 3 与各子实体样品和分离株 rDNA ITS 序列最相似的真菌

Table 3 Fungal species from the GenBank database with highest sequence similarity to each sample or isolate

样品 Code	最相似物种 BLAST match	登录号 Accession No.	相似率 Similarity (%)
Ru02	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru03	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru06	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru07	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru08	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru14	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru16	<i>R. claroflava</i>	AY061665	0.89
Ru22	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru42	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru46	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.90
Ru47	<i>R. vinosa</i>	AF418638	0.88
Ru48	<i>R. curtipes</i>	AY061668	0.87
Ru201	<i>Sepedonium chalcipori</i>	AF054865	0.88
R3	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	AB086629	0.99
Ru-yn	<i>Amanita</i> sp. Po7-wu3-1	AY208789	0.89

的相似性均未达到同一个种的水平。BLAST match 结果同样显示, 组织分离株 Ru201 与瘤孢属 (*Sepedonium*) 真菌相近, R3 与玫烟色拟青霉 (*Paecilomyces fumosoroseus*) 在 ITS 区段序列达到 99% 同源, Ru-yn 与鹅膏属 (*Amanita*) 真菌相近, 这几属真菌与红菇属的关系比较远, 特别是前两者。

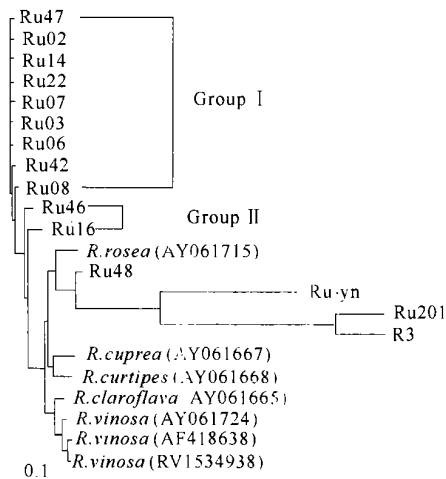


图 2 基于红菇分离株、子实体及来自 Genbank 的最相似物种的 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree inferred from rDNA ITS sequences of *Russula* isolates, fruitbodies and species from the GenBank with high sequence similarity

## 3 讨论

无论是 rDNA ITS 区段 bp 长度、序列同源性, 还是与三大核酸序列数据库的 Blast 结果, 均明显表明 3 个红菇组织分离株与红菇属真菌之间的亲缘关系相去甚远, 根本不是红菇属的组织分离株。Ru201 与瘤孢属真菌相近, R3 与玫烟色拟青霉在 ITS 区段达到 99% 同源, Ru-yn 与鹅膏属真菌相近, 这几属真菌与红菇属的关系比较远, 特别是前二者。瘤孢属真菌的有性时代为子囊菌寄生菌属 [*Hypomyces* (Fr.) Tul.], 该属真菌多数寄生于高等担子菌的子实体上<sup>[13]</sup>, 而红菇属和乳菇属 (*Lactarius*) 一样, 常被菌寄生菌属所寄生, 因此, 由于红菇属真菌很难分离, 好不容易在斜面上长起来的菌落就有可能是红菇子实体内的寄生菌或杂菌, 故曾东方等<sup>[14]</sup>曾用 RAPD 法检测 8 个菌株均不是红菇的分离株, 蔡小玲等<sup>[15]</sup>在对野生红菇的分离纯化中发现有黑盘孢科 (Melanconiaceae) 盘多孢属 (*Monochaetia* Sacc.) 的真菌存在。我们分离得到的多个菌株的 PDA 斜面菌落形态和菌丝体具有与一般伞菌目真菌菌丝体明显不同的特征, 在推测这些分离株很可能也是红菇子实体内的寄生菌的情况下, 采用分子生物技术, 进一步鉴

别了分离菌株的真伪。因此,在常规方法无法鉴别真菌分离株的真伪时,分子生物学手段是一种快捷有效而且必要的途径

本文使用的是真菌通用引物,在对 rDNA ITS 区段的多次 PCR 扩增中,其产物基本为唯一带,偶尔在 1400bp 附近会出现一条弱带,调整 PCR 反应条件可避免该弱带出现。此外,本文采用 PCR 产物直接测序法,测序中所表现出的信号是由处于主导地位的产物决定的,避免了克隆测序所导致的缺陷

常规红菇属真菌分类主要依靠子实体的形态、颜色、气味、孢子印、孢子大小、孢子纹饰等,这些形态特征经常是易变的、模糊的、易混淆的,要准确鉴定红菇属真菌红菇到种很困难,比如广西浦北食用红菇就有正红菇、鳞盖红菇、血红菇 (*R. sanguinea*),蔷薇色红菇 (*R. rosacea*)<sup>[2,4,6]</sup> 等多种。图 2 也显示来自浦北的 Ru16、Ru46 与 Ru22、Ru47 分属于 2 个不同的类群(种),不但如此,从 rDNA ITS 区段序列相似性来看,本文所有的子实体样本与 GenBank 中已知的正红菇、鳞盖红菇 (*R. lepida*),红色红菇 (*R. rosea*) 等均未达到同一个种程度,遗传距离大于 0.1。可能在浦北产区大量生长的食用红菇本来就有多种,只是受鉴定样本的限制而得到不同的结论,也可能是本来属于同一种的由于地理差异或者是本文所用分析手段产生误差。通常认为 rDNA ITS 序列变异较快,可以提供较丰富的变异位点和信息位点,其序列差异既可用于分子系统学研究,也可用于种间差异的鉴别<sup>[16]</sup>。但是不同的生物类群因其起源时间及进化(分化)速率不一样,其 ITS 序列所含有的信息量不同,价值也不一样,仅仅根据 ITS 序列研究和判别红菇的种群关系可能是不全面的,还需要结合其它 DNA 分析手段才能作出更科学、更准确的判断。因此,有必要结合形态特征及其它的分子生物学方法,对广西食用红菇做进一步深入研究

#### 致谢

感谢广西大学莫天砚教授惠赠菌株,广西科学院生物研究所莫新春同志协助数据处理。

#### 参考文献

- 1 Miller S L, McClean T M. Molecular phylogeny of the genus *Russula* in Europe with a comparison of modern infrageneric classifications. *Mycologia Research*, 2002, 106 (3): 259- 276.
- 2 Li Haiying, Fan Jiaye, Wang Guiwen, et al. Taxonomy, morphology and ecology of *Russula lepida* in Pubei Region

of Guangxi Province, China. In: Brundett M, Dell B, Malajczuk N, et al. eds. *Mycorrhizas For Plantation Forestry in Asia*. ACIAR PROCEEDING, 1995, 62: 31- 33.

- 3 范嘉晔,李海鹰,周兴,等.鳞盖红菇 (*Russula lepida*) 菌丝体对碳氮源的利用试验. *广西科学*, 1996, 3(2): 46- 47.
- 4 韦仕岩,莫天砚,刘斌,等.广西浦北六万山红锥林的红菇及其生态环境的调查研究. *广西农业大学学报*, 1998, 17(1): 25- 32.
- 5 CJ阿历索保罗, CW 明斯, M 布莱克韦尔.菌物学概论.姚一建,李玉等译.北京:中国农业出版社, 2002.
- 6 李海鹰,王桂文,范嘉晔,等.红菇与红锥形成的根共生体的描述. *微生物学通报*, 2000, 27(3): 182- 184.
- 7 Horton T, Bruns T. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 1855- 1871.
- 8 Rosling A, R Landeweert, B D Lindahl, et al. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist*, 2003, 159: 775- 783.
- 9 Landeweert R, Leeflang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 327- 333.
- 10 Tedersoo L, Hallenberg N, Larsson K H, et al. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist*, 2003, 159: 153- 165.
- 11 Bruns T D, Szaro T M, Gardes M, et al. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 257- 272.
- 12 White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press Inc, 1990. 315- 322.
- 13 邓叔群.中国的真菌.北京:科学出版社, 1963. 161- 162.
- 14 曾东方,罗信昌.应用 RAPD 分析快速鉴定外生菌根蘑菇分离物的真伪. *林业科学*, 2001, 37(6): 59- 65.
- 15 蔡小玲,葛刚,郭勇,等.野生红菇的分离纯化培养初探. *广州食品工业科技*, 2003, 19(2): 30- 31.
- 16 Gardes M, T D Bruns. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 113- 118.

(责任编辑:邓大玉)